

PATENT ABSTRACTS OF JAPAN

(11)Publication number : 61-104784 (JP, 3-1949, B2)

(43)Date of publication of application : 23.05.1986

(51)Int.Cl.

C12N 9/08
// (C12N 9/08
C12R 1:645)

(21)Application number : 59-225485

(71)Applicant : SUNTORY LTD

(22)Date of filing : 26.10.1984

(72)Inventor : SHINMEN YOSHIJI
ASAMI SUMIO
AMANO NORIHIDE
AMACHI TERUO
YOSHIKUNI HAJIME

(54) PRODUCTION OF PEROXIDASE

(57)Abstract:

PURPOSE: To prepare a peroxidase useful as a clinical diagnostic reagent and a labeled enzyme for enzymatic immunoassay, etc., by culturing a peroxidase-producing microbial strain belonging to Coprinus genus, and separating the objective enzyme from the culture product.

CONSTITUTION: The spore, mycelium, etc. of the above microbial strain such as Coprinus cinereus IFO 8371 deposited in the Institute of Fermentation (IFO) is inoculated in a liquid or solid medium, and cultured. When the medium is liquid, a medium containing 0.1W10wt% carbon source and 0.01W5wt% nitrogen source is used in general, and the cultivation is carried out at 10W42° C and 4W10pH under aeration and agitation, under shaking, or without agitation. The peroxidase is accumulated in the culture product. The microbial cells and insoluble matters are removed from the culture liquid e.g. by centrifugal separation, and the obtained crude enzyme liquid is subjected to one or more conventional enzyme purification processes to effect the separation and recovery of the objective peroxidase in purified state.

LEGAL STATUS

[Date of request for examination]

[Date of sending the examiner's decision of rejection]

[Kind of final disposal of application other than the examiner's decision of rejection or application converted registration]

[Date of final disposal for application]

[Patent number]

[Date of registration]

[Number of appeal against examiner's decision of rejection]

[Date of requesting appeal against examiner's decision of rejection]

[Date of extinction of right]

English Translation of JP, 3-1949, B

* NOTICES *

1. This document has been translated by computer using translation software, PAT-Transer V7 produced by Cross Language Inc. So the translation may not reflect the original precisely.
 2. The word which can not be translated is expressed by Japanese character.
 3. The drawings and tables are not translated.
-

[Claims for the Patent]

1. A microbe having peroxidase production ability to belong to コプリヌス・シネレウス (Coprinus cinereus) is cultured in a liquid nutrient medium, it is production method of a peroxidase including gathering the peroxidase which does not include アイゾザイム secreted by the end of a liquid nutrient medium substantially.

2. A microbe, コプリヌス・シネレウス f. ミクロスポラス (Coprinus cinereus f. microsporous) IFO 8371,

コプリヌス・シネレウス IFO 30114,

コプリヌス・シネレウス IFO 30627,

コプリヌス・シネレウス IFO 30628,

And

コプリヌス・シネレウス IFO 31333,

A method as claimed in claims Clause 1 selected out of a group of かななる.

[Detailed Description of the Invention]

(a field of industrial application)

The present invention relates to a manufacturing process of a peroxidase by a microbe, a manufacturing process of the peroxidase that it is produced in detail by basidiomycete belonging to the コプリヌス genus, and color development does four - Amino antipyrine (it is abbreviated to "four - AA as follows) - phenol system, three - methyl -2 - ベンゾチアゾリノンヒドラゾン (it is abbreviated to MBTH as follows) - diethyl aniline (it is abbreviated to DEA as follows) system and 2, 2 ' - アジノ - di- (three - エチルベンゾチアゾリン) -6 - sulfonic acid (it is abbreviated to ABTS" as follows) as a hydrogen donor.

(prior art)

It is an oxidized enzyme, and in late years, as for the peroxidase, is used various kinds of compounds as chemical reagent for clinical diagnoses with various kinds of oxidation enzymes in the presence of oxygenated water by glucose, cholesterol, phosphatide and fixed-quantity of an uric acid, is used as a mark enzyme in enzyme immunity test method again, but, for the source of supply, plants such as West wasabi, a Japanese radish are used mainly. However, it is necessary to divide isozyme to get a pure enzyme to use as a diagnostic reagent so that the isozyme that properties are slightly different is included in ペルオキシダーゼ of these plant origins, there is a problem to need at all trouble.

As for the peroxidase of the microbe origin, various, it is known, for example, there are

bacteria and チトクローム C peroxidase or NADH ペルオキシダーゼ which a filamentous fungus produces, but it is improper so that these use as clinical diagnosis business chemical reagent with an aspect of the 特異性 not normal West wasabi and a nonspecific peroxidase coming from each of a Japanese radish. In addition, in late years was produced two O- Zia ti gin by the microbe that a hydrogen donor and a peroxidase to grind belonged to colon bacillus and the Miro cesium genus, but two O- Zia ti gin tends use to the clinical diagnosis medicine to be evaded to have carcinogenesis operation, it is not suitable for use as the also diagnostic reagent. (a problem to be solved by the invention)

The people of present invention examined productivity of the peroxidase which did coloration by color couplers such as four - AA - phenol system, MBTH - DEA system and ABTS about various kinds of microbes to get clinical diagnosis use chemical reagent and ペルオキシダーゼ which could be used as mark enzymes in an enzyme immunity examination from a fast microbe of an increase same as conventional West wasabi or the peroxidase which came from a Japanese radish. As a result, the コプリヌス genus is belonged to, a microbe having peroxidase high production ability is found, the present invention was finished.

(constitution of invention)

コプリヌス・シネレウス f. ミクロスボラス (Coprinus Cinereus f. microsporous) IFO 8, 371 kept for a microbe having genus するペ ルオキシダーゼ production ability in the コプリヌス genus in the present invention by Inst. for Fermentation, Osaka (IFO) Foundation, コプリヌス・シネレウス IFO 30, 114, コプリヌス・シネレウス IFO 30, 627, コプリヌス・シネレウス IFO 30, 628, コプリヌス・シネレウス IFO the 31, 333rd class are put up.

A spore of the strain, a spawn or the previous culture fluid which it is cultured beforehand, and was provided is inoculated into a liquid nutrient medium, and it is cultured to culture these strains. In the case of a liquid nutrient medium, the things which are generally used such as glucose, cell toes, xylose, saccharose, maltose, soluble starch, sugared water, glycerol, mannitol can use both as a carbon source. An organic nitrogen source and inorganic nitrogen sources such as sodium nitrate, ammonium nitrate such as urea can be used as a nitrogen source other than natural nitrogen sources such as peptone, yeast extract, malt extract, meat extract essence, カザミノ acid, corn Chee pre-car. In addition, inorganic salt and vitamins such as a phosphate, a magnesium sulphate, iron sulfate, copper sulfate can be used as a very small amount of nourishment source if necessary, too. If these nutrient medium ingredients are the density that does not hurt growth of a microbe, there is not a limit in particular. Generally a percent by weight is preferable, and a percent by weight is preferable, and carbon source 0.1-10 had better assume 1-5 percents by weight, nitrogen source 0.01-5 the density of 0.1-2 percents by weight in practical use. In addition, 10-42 degrees Celsius are preferable, and culture temperature assumes 30-37 degrees Celsius, preferably, for 6-9, it breathes, and it is agitated, and PH 4-10 of a nutrient medium culture, shaking culture or 静置培養 is performed. Culture usually takes place in 3-14 days.

A nitrogen source, inorganic salts, a very small amount of nourishment source can be added

into this case by the end of a nutrient medium if necessary. It is preferable to use a liquid nutrient medium for mass culture.

As thus described it is cultured, and a peroxidase produces by the end of a culture, and it accumulates. Collection of a peroxidase is performed like next from all over the culture fluid.

After the culture end, a rough enzyme is got except a cell body and an insoluble matter by centrifugal separation and furnace hyperなどの固液分離手段 than culture fluid.

In this way, for example, a purified peroxidase can be got by what independent, or normal enzyme refinement methods such as an alternate method, dialysis, isoelectric point deposition method and column chromatography are put together for an alternate method, an ammonium sulfate, and it is used as for an organic solvent from provided rough enzyme liquid.

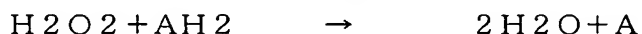
For example, the measurement of ペルオキシダーゼ activity of the present invention effects as a hydrogen donor using four - AA - phenol system as follows. 0.1% phenol solution 1.3ml, four 0.2% - AA solution 0.25ml and 0.02% hydrogen peroxide solution 0.2ml are that is to say added into 0.1M phosphoric acid buffer (PH7.0) 1ml, enzyme liquid 0.25ml are added to this after preheat to 37 degrees Celsius, and it is reacted for 10 minutes. 20% sodium azide solution 0.2ml are added after reaction, absorbance of 500nm is measured, and it is assumed reaction value. Water 0.2ml are added as Kon fatty tuna - roux in substitution for a hydrogen peroxide solution particularly, and reaction is done, absorbance is measured by similar operation, and it is done with control values. As for unit U (a unit) of ペルオキシダーゼ titer, is expressed four - AA - phenol of one μ mol for quantity of oxidized (oxygenated water of one μ mol is that is to say used) enzyme between one minute, the enzyme night or peroxidase titer (U / ml) of culture fluid is established in $0.198 \times \Delta$ O.D. 500 (enzyme liquid or a dilution ratio of culture fluid). In addition, Δ O.D. 500 shows the value that attracted control values from reaction value in an upper expression.

It is shown to that property.

(1) Operation peculiarity,

As for this enzyme, a catalyst does the oxidation of various kinds of compounds in the presence of oxygenated water. The operation mechanism is the next expression street.

ペルオキシダーゼ



But, as for AH₂ in an expression, A is] showing an oxidized hydrogen donor with a hydrogen donor [again

(2) Peculiarity as opposed to a hydrogen donor,

Peculiarity as opposed to various kinds of hydrogen donors of this enzyme is shown to table

(3) 至適 PH,

In the range of PH3.5-5.5, in the 0.1M acetic acid buffer, the range of PH5.5-8.0, the 0.1M phosphoric acid buffer, the range of PH7.5-9.0 examined the 0.1M tris - hydrochloric acid buffer, the range of PH8.5-9.0 at the combination ratio same as the active measurement using a 0.1M glycine - sodium hydroxide buffer. The result is shown to FIG. 1.

(4) Temperature in a solstice for suitable crops,

The result that measured enzyme activity in 10-90 degrees Celsius is shown to FIG. 2.

(5) PH stability

In the range of PH3.5-5.0, in the 0.1M acetic acid buffer, the range of PH6.0-8.0, in the 0.1M phosphoric acid buffer, the range of PH8.0-9.0, 0.1M tris - hydrochloric acid buffer, PH9.0-12.0 use a 0.1M glycine - sodium hydroxide buffer, after enzyme liquid 0.1ml were added into these buffer solution 0.9ml, it was left unattended to 30 degrees Celsius for 16 hours. After having diluted this processing enzyme liquid to 10 times in a 0.02M phosphoric acid buffer (PH7.0), 活性 was measured. The result is shown to FIG. 3.

(6) 温度安定性,

The enzyme liquid which enzyme liquid 0.1ml are added into 0.02M phosphoric acid buffer (PH7.0) 1.9ml, and was prepared is kept various kinds of temperature of 10-90 degrees Celsius for 30 minutes, after processing, it is cooled in iced water promptly for 10 minutes, survival enzyme activity was measured. The result is shown to FIG. 4.

It is shown to that example of the present invention next.

(example 1)

Was in a test tube of diameter 24mm, and glucose 1%, poly peptone 0.5%, nutrient medium (PH6.0) 10ml including yeast extract 0.3% were sterilized at 120 degrees Celsius for 15 minutes. コブリス・シネレウス IF0 8371-1 platinum ear is inoculated, a shaking was cultured at 30 degrees Celsius by shaking culture fluid (300rpm) for six days. A furnace spends culture fluid, as a result of having measured a ペルオキシダーゼカ value of furnace liquid, it was 1.3U / ml.

(example 2)

Example 1 is followed, as a result of having cultured コブリス・シネレウス IF030627 similarly for seven days, the ペルオキシダーゼ activity of culture furnace liquid was 3.4U / ml.

(example 3)

Was in 500ml 容三角 flask, and nutrient medium 100ml of composition same as example 1 were sterilized at 120 degrees Celsius for 20 minutes. One platinum ear of コブリス・シネレウス IF0 30628 is inoculated, a shaking was cultured at 34 degrees Celsius with Rais Cipro shaker (110rpm) for six days. A furnace spends culture fluid, as a result of having measured a ペルオキシダーゼカ value of furnace liquid, it was 1.7U / ml.

[Brief Description of the Drawings]

FIG. 1 is a graph showing reaction PH and relations with relative activity of a present invention peroxidase, and FIG. 2 is a graph to show reaction temperature and relations with relative activity to, and FIG. 3 is a graph to show PH stability to, and FIG. 4 is a graph to show temperature stability to.

⑫ 特 許 公 報 (B 2) 平3-1949

⑬ Int. Cl.⁹
C 12 N 9/08
//C 12 N 9/08
C 12 R 1:645

識別記号 庁内整理番号
7823-4B

⑭ 公告 平成3年(1991)1月11日

発明の数 1 (全4頁)

⑮ 発明の名称 ペルオキシダーゼの製造法

⑯ 特 願 昭59-225485

⑰ 公 開 昭61-104784

⑱ 出 願 昭59(1984)10月26日

⑲ 昭61(1986)5月23日

⑳ 発 明 者 新 免 芳 史 大阪府三島郡島本町若山台1丁目1番1号 サントリー株式会社応用微生物研究所内
㉑ 発 明 者 浅 見 純 生 大阪府三島郡島本町若山台1丁目1番1号 サントリー株式会社応用微生物研究所内
㉒ 発 明 者 天 野 典 英 大阪府三島郡島本町若山台1丁目1番1号 サントリー株式会社応用微生物研究所内
㉓ 発 明 者 天 知 輝 夫 大阪府三島郡島本町若山台1丁目1番1号 サントリー株式会社応用微生物研究所内
㉔ 発 明 者 吉 栖 肇 大阪府三島郡島本町若山台1丁目1番1号 サントリー株式会社応用微生物研究所内
㉕ 出 願 人 サントリー株式会社 大阪府大阪市北区堂島浜2丁目1番40号
㉖ 代 理 人 弁理士 湯浅 恭三 外5名
㉗ 審 査 官 平 田 和 男
㉘ 参 考 文 献 J. Gen. Appl. Microbiol., 26(3). (1980) P. 229-238
American Journal of Botany, 60(4suppl). (1973) P. 26

1

2

㉙ 特許請求の範囲

1 コプリヌス・シネレウス (*Coprinus cinereus*) に属するペルオキシダーゼ生産能を有する微生物を液体培地で培養し、液体培地中に分泌された、アイソザイムを実質的に含まないペルオキシダーゼを採取することを特徴とするペルオキシダーゼの製造方法。

2 微生物が、

コプリヌス・シネレウス f. ミクロスポラス (*Coprinus cinereus* f. *microsporous*) IFO 8371 ;

コプリヌス・シネレウス IFO 30114 ;

コプリヌス・シネレウス IFO 30627 ;

コプリヌス・シネレウス IFO 30628 ;

および

コプリヌス・シネレウス IFO 31333 ;

からなる群から選択される、特許請求の範囲第1

項記載の方法。

発明の詳細な説明

(産業上の利用分野)

本発明は微生物によるペルオキシダーゼの製造法、更に詳しくはコプリヌス属に属する担子菌によつて生産され、4-アミノアンチピリン (以下「4-AA」と略す)-フエノール系、3-メチル-2-ベンゾチアゾリノンヒドラゾン (以下「MBTH」と略す)-ジエチルアニリン (以下「DEA」と略す) 系、及び2, 2'-アジノージー (3-エチルベンゾチアゾリン)-6-スルホン酸 (以下「ABTS」と略す) を水素供与体として発色するペルオキシダーゼの製造法に関する。

(従来技術)

15 ペルオキシダーゼは、過酸化水素の存在下で種々の化合物を酸化する酵素であり、近年臨床診断用試薬として、グルコース、コレステロール、

リン脂質及び尿酸の定量に種々のオキシダーゼと共に使用されており、又、酵素免疫試験法における標識酵素として使用されているが、その供給源としては、主に西洋ワサビ、大根等の植物が用いられている。しかしながら、これらの植物由来のベルオキシダーゼには、性質が僅かずつ異なるアイソザイムが含まれるため、診断試薬に用いる純粋な酵素を得るには、アイソザイムを分離する必要がある、非常に手間を要するという問題がある。

微生物起源のベルオキシダーゼも各種知られており、例えば細菌及び糸状菌の生産するチトクロームCベルオキシダーゼやNADHベルオキシダーゼなどがあるが、これらは通常の西洋ワサビ及び大根のそれぞれに由来するような非特異的なベルオキシダーゼではなく、その特異性の面で、臨床診断用試薬に用いるには不適である。又、近年オージアニシジンを水素供与体とするベルオキシダーゼが、大腸菌及びミロセシウム属に属する微生物から生産されたが、オージアニシジンは発癌作用を有するため、その臨床診断薬への使用は回避される傾向にあり、やはり上記診断試薬としての使用には適していない。

(発明が解決しようとする課題)

本発明者らは、従来の西洋ワサビ或いは大根に由来するベルオキシダーゼと同様に、臨床診断用試薬及び酵素免疫試験における標識酵素などとして使用し得るベルオキシダーゼを増殖の速い微生物から得るために、種々の微生物について、4-AA-フェノール系、MBTH-DEA系及びABTS等の発色剤により呈色するベルオキシダーゼの生産性を検討した。その結果、コプリヌス属に属し、ベルオキシダーゼ高生産能を有する微生物を見出し、本発明を完成した。

(発明の構成)

本発明においてコプリヌス属に属するベルオキシダーゼ生産能を有する微生物としては、財団法人発酵研究所 (IFO) に保管されているコプリヌス・シネレウス f. ミクロポラス (Coprinus cinereus) f. microsporous) IFO 8371、コプリヌス・シネレウス IFO30114、コプリヌス・シネレウス IFO30627、コプリヌス・シネレウス IFO30628、コプリヌス・シネレウス IFO31333等があげられる。

これらの菌株を培養するためには、その菌株の孢子、菌糸あるいは予め培養して得られた前培養液を液体培地に接種し培養する。液体培地の場合に、炭素源としてはグルコース、フラクトース、キシロース、サツカロース、マルトース、可溶性澱粉、糖蜜、グリセロール、マンニトール等の一般的に使用されるものがいずれも使用できる。窒素源としてはペプトン、酵母エキス、麦芽エキス、肉エキス、カザミノ酸、コーンスチープリカー等の天然窒素源の他に、尿素等の有機窒素源ならびに硝酸ナトリウム、硝酸アンモニウム等の無機窒素源を用いることができる。この他に必要に応じてリン酸塩、硫酸マグネシウム、硫酸鉄、硫酸銅等の無機塩及びビタミン等も微量栄養源として使用できる。これらの培地成分は微生物の生育を害しない濃度であれば特に制限はない。実用上一般に、炭素源は0.1~10重量%、好ましくは1~5重量%、窒素源は0.01~5重量%、好ましくは0.1~2重量%の濃度とするのがよい。又、培養温度は10~42℃、好ましくは30~37℃とし、培地のpHは4~10、好ましくは6~9として、通気攪拌培養、振盪培養もしくは静置培養を行なう。培養は通常3~14日間で行なわれる。

この場合に必要に応じて培地中に窒素源、無機塩類、微量栄養源を加えることができる。大量培養のためには液体培地を使用することが好ましい。

このように培養して培養液中にベルオキシダーゼが生成蓄積する。培養液中からベルオキシダーゼの採取は次のごとく行なう。

培養終了後、培養液より遠心分離及び濾過などの固液分離手段により菌体及び不溶物を除いて粗酵素を得る。

このようにして得られた粗酵素液から例えば有機溶媒分別法、硫酸分別法、透析、等電点沈殿法及びカラムクロマトグラフィー等通常の酵素精製方法を単独にあるいは組合せて用いることにより精製されたベルオキシダーゼを得ることができる。

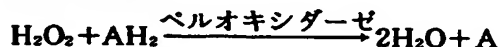
本発明のベルオキシダーゼ活性の測定は、水素供与体として例えば4-AA-フェノール系を使用して次のように行なう。即ち、0.1Mリン酸バッファー (pH7.0) 1mlに、0.1%フェノール溶液1.3ml、0.2% 4-AA溶液0.25ml及び0.02%過酸化

水素溶液0.2mlを加え、37℃に予熱後、これに酵素液0.25mlを加えて10分間反応させる。反応後20%アジ化ナトリウム溶液0.2mlを加え、500nmの吸光度を測定して反応値とする。別にコントロールとして過酸化水素溶液の代わりに水0.2mlを加えて反応を行ない、同様の操作によつて吸光度を測定しコントロール値とする。ペルオキシダーゼ力価の単位U(ユニット)は1分間に1μモルの4-AA-フェノールを酸化する(即ち1μモルの過酸化水素を消費する)酵素量として表わされ、酵素液又は培養液のペルオキシダーゼ力価(U/ml)は $0.198 \times \Delta 0.D_{500} \times (\text{酵素液又は培養液の希釈率})$ で求められる。なお、上式において $\Delta 0.D_{500}$ は反応値からコントロール値を引いた値を示す。

次に本発明で得られるペルオキシダーゼの性質を示す。

(1) 作用特異性;

本酵素は過酸化水素の存在下で種々の化合物の酸化を触媒する。その作用機構は次式に示す通りである。



〔但し式中 AH_2 は水素供与体を、又、 A は酸化された水素供与体を示す〕

(2) 水素供与体に対する特異性;

本酵素の種々の水素供与体に対する特異性を第1表に示す。

第 1 表

水素供与体	作用の強さ
フェノール	卅
ピロガロール	卅
P-アニシジン	++
O-ジアニシジン	卅
グアヤコール	++
ヒドロキノン	+
P-ヒドロキシ安息香酸	++
P-アミノ安息香酸	+
ABTS	卅

水素供与体	作用の強さ
ジエチルアニリン	±

(3) 至適pH;

pH3.5~5.5の範囲は0.1M酢酸バッファー、pH5.5~8.0の範囲は0.1Mリン酸バッファー、pH7.5~9.0の範囲は0.1Mトリスー塩酸バッファー、pH8.5~9.0範囲は0.1Mグリシンー水酸化ナトリウムバッファーを使用して、活性測定と同様の配合比率で検討した。その結果を第1図に示す。

(4) 至適作用温度;

10~90℃における酵素活性を測定した結果を第2図に示す。

(5) pH安定性

pH3.5~5.0の範囲は0.1M酢酸バッファー、pH6.0~8.0の範囲は0.1Mリン酸バッファー、pH8.0~9.0は0.1Mトリスー塩酸バッファー、pH9.0~12.0は0.1Mグリシンー水酸化ナトリウムバッファーを使用し、これらのバッファー溶液0.9mlに酵素液0.1mlを加えた後、30℃に16時間放置した。この処理酵素液を0.02Mリン酸バッファー(pH7.0)で10倍に希釈した後、活性を測定した。その結果を第3図に示す。

(6) 温度安定性;

0.02Mリン酸バッファー(pH7.0) 1.9mlに酵素液0.1mlを加えて調製した酵素液を10~90℃の種々の温度に30分間保ち、処理後、直ちに氷水で10分間冷却し、残存酵素活性を測定した。その結果を第4図に示す。

次に本発明の実施例を示す。

実施例 1

グルコース1%、ポリペプトン0.5%、酵母エキス0.3%を含む培地(pH6.0) 10mlを径24mmの試験管に入れ、120℃で15分間殺菌した。コブリヌス・シネレウスIFO8371の1白金耳を接種し、振盪培養機(300rpm)により30℃で6日間振盪培養した。培養液を濾過し、濾液のペルオキシダーゼ力価を測定した結果、1.3U/mlであつた。

実施例 2

実施例1に準じ、コブリヌス・シネレウスIFO30627を同様にして7日間培養した結果、培養濾液のペルオキシダーゼ活性は、3.4U/mlで

7

あつた。

実施例 3

実施例 1 と同じ組成の培地 100ml を 500ml 容三角フラスコに入れ、120℃で 20 分間殺菌した。コブリヌス・シネレウス IFO30628 の 1 白金耳を接種し、レシプロシエーカー (110rpm) により 34℃で 6 日間振盪培養した。培養液を濾過し、濾液のペルオキシダーゼ力価を測定した結果、1.7U/

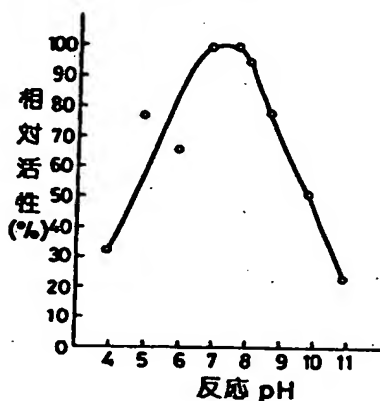
8

ml であつた。

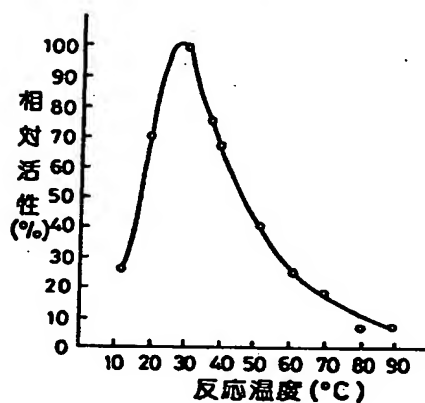
図面の簡単な説明

第 1 図は反応 pH と本発明ペルオキシダーゼの相対活性との関係を示すグラフであり、第 2 図は反応温度と相対活性との関係を示すグラフであり、第 3 図は pH 安定性を示すグラフであり、第 4 図は温度安定性を示すグラフである。

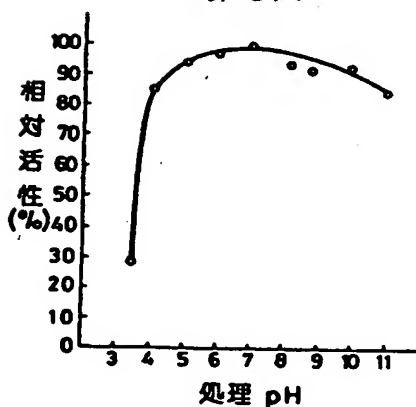
第 1 図



第 2 図



第 3 図



第 4 図

